

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-069899
(43)Date of publication of application : 14.03.1995

(51)Int.Cl. A61K 31/70
A61K 48/00
C07K 7/00
C12N 15/09
// C07H 21/04

(21)Application number : 05-241973 (71)Applicant : MITSUBISHI CHEM CORP
(22)Date of filing : 02.09.1993 (72)Inventor : SEKI MAKOTO
HONDA YOSHIKAZU
YAMADA SUGURU

(54) ANTIVIRAL AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an antiviral agent containing a specific inhibiting substance as an active component, having low side actions and useful for the prevention and treatment of diseases caused by viruses having IRES such as HCV.
CONSTITUTION: This antiviral agent contains, as an active component, a substance to inhibit the bonding of (A) a protein participating in the translation of a virus gene (preferably type-C hepatitis virus gene) by bonding to preferably Yn-Xm unit of the IRES region of the virus gene (Yn is an oligopyrimidine; Xm is a random nucleotid) and (B) the IRES region of the virus gene (preferably a compound forming a hybrid with the oligopyrimidine).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.06.2000
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2000 Japanese Patent Office

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-69899

(43) 公開日 平成7年(1995)3月14日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	AD Y	9454-4C		
48/00				
C 0 7 K 7/00		8318-4H		
C 1 2 N 15/09	Z N A			
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求 未請求 請求項の数 5 FD (全 23 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-241973

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(22) 出願日 平成5年(1993)9月2日

(72) 発明者 関 誠

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
菱化成株式会社総合研究所内

(72) 発明者 本多 喜員

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
菱化成株式会社総合研究所内

(72) 発明者 山田 英

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三
菱化成株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 長谷川 晩司

(54) 【発明の名称】 抗ウイルス剤

(57) 【要約】

【構成】 ウィルス遺伝子の5'非翻訳領域に存在する特異的な構造であるIRES (Internal Ribosome Entry Site) 領域に結合して該ウィルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウィルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する物質を有効成分とする抗ウイルス剤。IRES領域を有するウィルスとしては、例えばC型肝炎ウィルス、ポリオウイルス、脳心筋炎ウィルス、口蹄疫病ウィルス、ヒトライノウイルス等が挙げられる。

【効果】 本発明の抗ウイルス剤は、HCV等のIRESを有するウイルスに起因するウイルス性疾患に対する予防または治療薬を提供するものである。IRESが関与する翻訳機構は、通常の真核細胞の翻訳系にはほとんど見られない特殊なものであることから、副作用の少ない、極めて選択性の抗ウイルス剤としての利用が期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ウィルス遺伝子のIRES領域に結合して該ウィルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウィルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する物質を有効成分とする抗ウィルス剤。

【請求項2】 IRES領域のY_n - X_m ユニット (Y_n はオリゴピリミジンを表し、X_m はランダムヌクレオチドを表す) に結合してウィルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウィルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する物質を有効成分とする、請求項1記載の抗ウィルス剤。

【請求項3】 Y_n - X_m ユニットまたはその部分配列とハイブリッドを形成する化合物を有効成分とする請求項2に記載の抗ウィルス剤。

【請求項4】 オリゴピリミジンとハイブリッドを形成する化合物を有効成分とする請求項2または3に記載の抗ウィルス剤。

【請求項5】 ウィルス遺伝子がC型肝炎ウィルス遺伝子であることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の抗ウィルス剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は抗ウィルス剤に関し、詳細にはIRESと呼ばれる特異領域を有するウイルスが関与する各種疾患に対する治療または予防薬を提供するものである。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 近年、後天性免疫不全症候群 (AIDS) や肝炎に代表されるように、感染性のウイルス疾患が医学上、さらには社会的にも重篤な問題として認識されるようになった。これらのウイルス性疾患を治療する目的で、従来より種々の抗ウィルス剤が開発してきた。例えばわが国においてはアシクロビル、ビダラビン、ジドブシン (ジドチミジン)、イドクスウリジン、ガンシクロビル、インターフェロン等が販売されている。これらは、大別すると直接ウイルスの酵素の機能を阻害する薬物と、免疫機構を介してウイルスを攻撃する薬物との、大きく2つのタイプに分類される。

【0003】 このような抗ウィルス剤の開発は、年々盛んになりつつある。それは、慢性疾患と考えられてきたものが、実はウイルスがその原因であるということが往々にしてあるからである。また高齢化社会が進むに従い、潜伏感染していたウイルスが免疫力の低下した老人で発病する、いわゆる日和見感染の問題も、抗ウィルス剤の需要を喚起する一因となっている。

【0004】 ところが従来の抗ウィルス剤は、副作用が強すぎたり、薬剤耐性ウイルスが出現するなど、必ずしも満足のいくものが得られていないのが現状であった。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を鑑みて、従来にない新しい作用機序の抗ウイルス剤を開発するべく検討を重ねてきた。その結果、一部のウィルス遺伝子に見られる特殊な翻訳機構領域、IRES (Internal Ribosome Entry Site) に着目し、この機能を利用することでウイルス蛋白の翻訳を阻害できることを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】 すなわち本発明の要旨は、ウィルス遺伝子のIRES領域に結合して該ウィルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウィルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する物質を有効成分とする抗ウイルス剤に存する。以下、本発明につき詳細に説明する。本発明において、IRES領域とは、前述のように一部のウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域 (5' UTR) に存在する特異的な構造で、ポリオウイルス、脳心筋炎ウイルス、口蹄疫病ウイルス、ヒトライノウイルス等のピコルナウイルス科に属するウイルスや、C型肝炎ウイルス (以下、「HCV」と略記することがある) (J. Virol. 66, 1476-1483 (1992)) 等に存在する。この構造はステムループに富む複雑な高次構造をとると考えられ、この領域に結合してウイルス遺伝子の翻訳、転写に機能する宿主細胞タンパク質、例えば分子量52K (p52タンパク質)、57K (p57タンパク質)、50Kのタンパク質の存在が確認され (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5846-5850 (1990))、リボソームはこの宿主細胞タンパク質が結合したIRES領域を認識して結合することが知られている (Curr. Top. Microbiol. Immunol., 161, 23-47 (1990); Enzyme, 44, 292-309 (1990))。

【0007】 また、Jangらは、ピコルナウイルス5' UTRに存在するオリゴピリミジン (Y_n) とAUGトリプレットを含むY_n - X_m - AUGユニット (X_m : ランダムヌクレオチド) がIRESに多く存在すると述べており (in Translationally Regulated Genes in Higher Eukaryotes, 292-309, Base 1 (1990))、Pilipenkoらは、Y_n とAUGエレメント間の距離 (X_m) が22ヌクレオチド付近であり、このY_n エレメントがSD配列様の機能を果たしている可能性を示している (Cell, 68, 119-131 (1992))。

【0008】 本発明においては、ウイルス遺伝子のIRES領域に結合して該ウイルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウイルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する手段としては、前述のIRES領域に結合してウイルス遺伝子の翻訳、転写に機能する宿主細胞タンパク質とIRES領域との結合を阻害する方法が挙げら

れ、特にIRES領域のY_n - X_mユニット (Y_nはオリゴピリミジンを表し、X_mはランダムヌクレオチドを表す) に結合してウイルス遺伝子の翻訳に関与するタンパク質と該ウイルス遺伝子のIRES領域との結合を阻害する方法が挙げられる。従って本発明の抗ウイルス剤は、IRESに対する結合を宿主細胞タンパク質と拮抗する物質や、Y_n - X_mユニットとハイブリッドを形成して宿主細胞タンパク質との結合を阻害する化合物などが好適に用いられる。

【0009】以下にHCV遺伝子のIRES領域とハイブリッドを形成して宿主細胞タンパク質との結合を阻害する化合物（以下、「ハイブリッド化合物」と略記する）を提供する場合を例にとり、具体的に説明する。HCVは、1988年5月カイロン社が、従来の伝統的なウイルス探索法とは全く異なる方法により、その遺伝子断片を世界で初めて取得した。

【0010】C型肝炎が発症すると高い確率で急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝癌と移行し、患者を死亡させるが、今まで、HCVの発現または増殖を抑制する薬剤は見つかっておらず、HCVによるこの病状を治す薬剤の開発が待たれている。HCVの遺伝子は非常に変異しやすく、この変異によって、HCVにはいくつかのサブタイプの異なるものが見出されている。しかしHCV遺伝子のIRES領域は、ピコルナウイルスと同様に5'UTR領域に存在し、この領域はHCVの各サブタイプ間でも特に変異が少ない領域である。よってこの領域との相補鎖を作ることで、ウイルスのサブタイプに関係なくHCVの複製およびHCV遺伝子産物の発現を阻害することができる。

【0011】HCVの遺伝子は1本のRNA鎖から成るとされている。それにコードされているHCV由来蛋白質もまた1本のポリペプチドとして翻訳され、これを前駆体としてHCV遺伝子から生産されるウイルスの構造蛋白質（例えば、コア蛋白など）、RNAポリメラーゼ、プロテアーゼ、ヘリカーゼなどがプロセッシングされながら分かれてできるとされている。すなわち、最初にできる1本のポリペプチドの生産が阻害されれば、ウイルスのプロテアーゼも発現せず、ウイルスのRNAポリメラーゼによるHCVの複製も起こらないと考えられる。最終的には、HCV遺伝子由来蛋白質ができなければ、HCVは増殖しないことになる。

【0012】HCV遺伝子の阻害活性は、例えばHCV遺伝子の5'末端からE2の途中までのmRNAをT7RNAポリメラーゼ（ストラテージーン社製）を用いて合成し、ラビット赤血球ライセートとイヌのマイクロゾーマルメンブラン（ともにプロメガ社製）を用いたインビトロ翻訳系でHCV由来蛋白を合成し抗HCVコア抗体により免疫沈降させたコア蛋白質の量を測定して、HCV遺伝子からHCV由来蛋白の翻訳活性をみるとことにより、さらにはHCV遺伝子の5'末端から少なくとも

コア蛋白をコードする領域をワクシニアウイルスに挿入して組換ウイルスを作製し、これをヒト由来の細胞株に感染させることによって発現されるHCV由来ポリペプチドの産生量をみるとことにより測定することができる。

【0013】ハイブリッド化合物としては、デオキシリボヌクレオシド同志を結合しているホスホジエステル結合部のリン原子に二重結合している酸素原子が硫黄原子に置換されたホスホロチオエート型、硫黄原子の代わりにメチル基が導入されたメチルホスホネート型や無置換のホスホネート型、αオリゴヌクレオシド型など（Cooke, R. M. *Anticancer Drug Des.* (アンチキャンサー ドラッグ デザイン)、6, 606-646, 1991; Tidd, D. M. *Anticancer Research* (アンチキャンサー リサーチ)、10, 1169-1182, 1990) 等が使用できる。また、対象とした配列とハイブリッドを形成し、HCV遺伝子と対象とした領域において2本鎖を形成しうるものであれば、ヌクレオシド誘導体でなくても良い。さらに言えば、*Antisense research and Development* (アンセンス リサーチ ディベロップメント)、1, 65-113, 1991にChrisey, L. A. によって紹介されたアンセンスとして使われた総てのアンセンス化合物も、使用可能である。

【0014】また、ハイブリッド化合物としては、よりDNase抵抗性であることや、mRNAとハイブリッドした時、細胞内のRNaseH活性で相補鎖のRNAを分解できるものが望ましいことも容易に類推できる（Tidd, D. M. *Anticancer Research* (アンチキャンサー リサーチ)、10, 1169-1182, 1990）。また、全てのホスホジエステル結合部がホスホロチオエート型やメチルホスホネート型であるハイブリッド化合物においては、IRES領域とのハイブリッド形成能を上げながらもハイブリッド化合物自体の分解活性をあまり下げない手段として、5'末端側からと3'末端側からの数塩基のホスホジエステル結合をホスホロチオエート型やメチルホスホネート型にして内側の塩基のホスホジエステル結合は修飾しない方法等が挙げられる。

【0015】かかるハイブリッド化合物としては、IRES領域と相補的な配列を有するものであれば特に制限はされないが、好ましくは前述したY_n - X_mユニットに相補的な配列を有するもの、より好ましくはオリゴピリミジン領域であるY_nに相補的な配列を有するものであることが望ましい。HCV遺伝子のIRES領域には、オリゴピリミジン領域と推定される部位として、シトシンリッチな領域が見出される（例えば、配列表の配列番号1において33番目のシトシンから38番目のチミンまでの6mer、67番目のシトシンから73番目

のチミンまでの7mer、138番目のシトシンから142番目のシトシンまでの5mer、147番目のシトシンから157番目のシトシンまでの11mer、263番目のシトシンから267番目のシトシンまでの5merなど)。そこでHCVに対しては、ハイブリッド化合物としてグアニンリッチな配列を有するものが特に好みしい。具体的には、配列表の配列番号2~17に示すようなものが挙げられる。

【0016】またかかるハイブリッド化合物は、塩基の長さで表した場合、15merから30merの長さとなるように設計することが望ましい。なお、本発明ではハイブリッド化合物の構造を表すにあたり、便宜上「塩基配列」の形式による配列表として表したが、前述したように、対象とした配列とハイブリッドを形成し、HCV遺伝子のIRES領域において2本鎖を形成しうるものであるならば、必ずしもヌクレオシド誘導体である必要はない。またハイブリッド形成能を損なわない範囲において、一部の配列を任意の塩基、好みしくはプリンに置換しても差し支えない。

【0017】ハイブリッド化合物を培養細胞に取り込ませるには、例えば上記したハイブリッド化合物をそのまま培養液に含ませる等により可能であり、長さが15塩基から28塩基ぐらいのホスホロチオエート型やメチルホスホネート型であればこの条件で容易に取り込ませることができる。また、取り込みを積極的に行わせるために、動物細胞などで盛んに行われているトランスフェクション法(磷酸カルシウム法、エレクトロポーレーション法、リポソーム法など)を用いることも好みしい方法の一つである。

【0018】また、人体に投与する場合も、上記ハイブリッド化合物をそのまま静脈に送り込めば、動物実験などからも容易に推測できるように肝臓に半分ぐらいは吸収されると思われる。更に、ハイブリッド化合物の構造や性質によっては、リポソームなどで保護したり、ハイブリッド化合物に細胞を認識できる物質を付加するなどして取り込み効率を上げることもできる。ハイブリッド化合物の製造法およびその評価方法について以下にさらに詳細に述べる。

【0019】(1) mRNA T7N1-19の取得
例えば、プラスミドpUCT71-1.9(欧州公開特許公報第18313号)をアルカリ法、さらにはCsClを用いた密度勾配超遠心法で調整する。次に、該プラスミドをEcoRI等の制限酵素で完全に切断し、クローニングT7N1-19の3'側の1箇所で切断された線状DNAを得る。この線状DNA 1μg程度を用いて、インビトロトランскリプションをT7RNAポリメラーゼを用いて行わせることにより、HCV mRNA T7N1-19を約80から100μg得ることができる。この時の反応はストラテージー(Stratagene)社製のRNA TRANSCRIPTION

Kitを用いてもよいが、T7RNAポリメラーゼの活性条件であれば、別途、試薬を調整し反応させてもよい。得られたmRNAは、ノーザンハイブリダイゼーションで確認できる。プローブはクローンT7N1-19の3'末端領域のDNA断片を用いラベリング法で調整できる。定量は、波長260nmでの吸光度により計算できる。

【0020】(2) ハイブリッド化合物の合成

例えばアプライドバイオシステム社(Applied Biosystems社)のDNAシンセサイザー394型を用いることにより、ホスホジエステル型のオリゴヌクレオチドもホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドも合成することができる。反応はジメトキシトリチル基ONで行い、HPLCで精製し(目的産物のジアステレオマーは全て1つにまとめた)、その後、酢酸処理で目的のハイブリッド化合物を調整できる。

【0021】(3) インビトロトランスレーション法を用いたハイブリッド化合物によるHCV由来蛋白合成阻害効果

上記(1)で作成したmRNAを用いてインビトロトランスレーションを行い、該mRNAにコードされているHCV由来蛋白のIRES活性のもとで発現させる。

【0022】インビトロトランスレーションは、例えばプロメガ(Promega)社製のウサギ赤血球ライセート、イヌマイクロゾーマルメンブランを用いる。マイクロゾーマルメンブランはコア蛋白とエンベロープ(E1)の間とエンベロープ(E1)とE2(NS1)の間をシグナルペプチダーゼで切断させるのに必要と考えられる。翻訳されたポリペプチドには[³⁵S]メチオニンが取り込まれる。抗HCVコア抗体によりHCVコア蛋白質を含むポリペプチドを免疫沈降させ、これをSDS-PAGE電気泳動させて、富士写真フィルム社製バイオイメージアナライザ(BAS2000(BIO-IMAGE ANALYZER)等を用いることにより解析することができる。

【0023】ハイブリッド化合物は、mRNAとインビトロトランスレーション用試薬が混ざる直前にインビトロトランスレーション試薬に混ぜ、翻訳阻害効果を見ることが好みしい。その結果、HCV遺伝子配列から設計しうる長さ15塩基から30塩基以下のハイブリッド化合物が阻害効果に深く関わっていることが確認される。

【0024】(4) 組換えワクシニアウイルスを用いた細胞評価系における、ハイブリッド化合物によるHCV遺伝子の翻訳阻害効果

外来遺伝子の両端にワクシニアウイルス中の特定部位の配列を連結したものは、かかる部位とワクシニアウイルス遺伝子中の対応配列との間に相同意組換えが起こることが知られている。この方法を用いてHCV遺伝子を導入した組換えワクシニアウイルスを作製し、これを適当

な細胞に感染させることにより細胞中でHCV遺伝子を発現させることができるので、翻訳されるHCVタンパクをアッセイする適当な評価系を構築することにより、ハイブリッド化合物による翻訳阻害効果を測定することができる。

【0025】具体的には、後述の実施例に示すように、HCV由来の遺伝子をワクシニアウイルスのヘマグルチニン(HA)遺伝子中に挿入する。HAはワクシニアウイルスの増殖に必須ではない。またHA遺伝子の機能が失われた場合、そのようなワクシニアウイルスを血球凝集機能の喪失として、ニワトリ赤血球によるウイルスラークの染色等により同定することができることから、外来遺伝子の挿入部位として好適に使用される。しかしかかる部位としては、外来遺伝子の挿入によりウイルスの増殖が本質的な影響を受けず、しかも外来遺伝子が挿入されたウイルスの簡単な同定を可能にする部位であるならば、特に制限はされない。挿入するHCV由来の遺伝子としては、HCV由来のものであり、5'側の非翻訳領域にあるIRES領域を含む遺伝子が必要である。前述したように、HCV遺伝子がコードするポリペプチドはまず約3,000アミノ酸からなる1本のポリペプチド(前駆体タンパク質)として翻訳され、これがプロセッシングを受けて各機能タンパクができるとされている。前駆体タンパク質はN末端側からコア蛋白、E1(エンベロープ)蛋白、E2(NS1あるいはエンベロープ2)蛋白などがこの順で続いているので、HCV遺伝子の構成も5'末端側から非翻訳領域、コア蛋白をコードする遺伝子、E1蛋白をコードする遺伝子等と続く。よってHCVポリペプチドの翻訳阻害効果を測定するためには、正常にHCV由来ポリペプチドが產生される必要があるので、挿入するHCV由来の遺伝子は5'側非翻訳領域にあるIRES領域を含み、かつその3'側に続くコア蛋白をコードする遺伝子を少なくとも含む遺伝子でなければならない。具体的には、配列表の配列番号1に記載の塩基配列において、5'末端の25~30番目から910bp程度の長さの塩基配列で表される遺伝子が挙げられる。この場合、コア蛋白が発現されればウエスタンブロッティングにより約22kDaの蛋白として確認することができる。

【0026】かかるHCV由来の遺伝子は、その5'上流側にプロモーターを連結してpUC19等のベクターに挿入される。プロモーターとしては、ワクシニアウイルス内で機能するものであれば特に制限はされない。好ましくは、ワクシニアウイルス由来のearlyプロモーターで、高発現のプロモーターが使用される。具体的には、ワクシニアウイルス由来の7.5kプロモーター(Cell, 125, 805-813, 1981)、もしくはこれに点変異を導入して改変したもの(J. Mol. Biol., 210, 749-769, 1988)等が挙げられる。また発現量を増強させる目的で、配列

表の配列番号27に示すような合成DNAを前記プロモーターと組み合わせて使用することも好ましい態様の一つである。また、HCV由来遺伝子の3'側にルシフェラーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子を挿入しておくと、この融合遺伝子が翻訳されて融合蛋白が発現される。融合蛋白はHCV由来ポリペプチドとレポーター遺伝子がコードするポリペプチドとが融合されたものであることから、適当な条件下でプロセッシングをかけてレポーター遺伝子がコードするポリペプチドを測定することにより、間接的にHCV由来ポリペプチドを測定することができる。HCV遺伝子には、コア蛋白とE1蛋白とをプロセッシングするシグナル配列が存在する。従って、HCVコア蛋白の翻訳阻害効果を測定する場合は、このシグナル配列を利用してコア蛋白のC末端が切断されるよう設計することが望ましい。ベクターの構築は、常法に従って行うことができる。

【0027】かくして得られるトランスファーベクターから、ベクターDNAを常法に従って調製し、このDNAとワクシニアウイルスの野生株とを混合することによって相同性組換えを行わせる。こうして得られた組換えワクシニアウイルスを、例えばヒト由来の細胞株に感染させる。この感染細胞中に組換えタンパクが発現されるので、感染細胞の培養物から常法に従ってタンパク成分を得、ウエスタンブロッティング等によりHCV由来のポリペプチドを測定することができる。

【0028】ハイブリッド化合物は、組換えワクシニアウイルスを細胞株に感染させる前及び/又は後に添加される。対象としてハイブリッド化合物を加えないときの組換えHCV由来ポリペプチドの產生量、又はIRES領域の相補鎖とホモロジーの低い、すなわちハイブリッドをほとんど形成しない化合物を加えたときの組換えHCV由来ポリペプチドの產生量等と比較を行うことにより、ハイブリッド化合物の翻訳阻害効果を求めることができる。

【0029】かかるハイブリッド化合物を抗ウイルス剤として使用する際には、当該化合物を経口により、または静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与等の注射剤として、さらには坐剤中に封入して用いることもできる。このとき、必要に応じて薬学的に許容され得る担体を常法に従って調製・含有させることもできる。ハイブリッド化合物の投与量に関しては、アンチセンス化合物においてアメリカのバイオベンチャー会社をはじめ多くのグループから論文や学会などで発表され、それらによると培養細胞(動物細胞)などで10から100μMで効果を示すアンチセンス化合物は、人体においてもある程度の効果を示すという例がHIV患者などの難治病患者に対して得られている。従って本発明においても、ハイブリッド化合物を1日あたり100μM以下、好ましくは0.1~50μMの濃度となるように使用することが好ましい。なお言うまでもないが、かかる投与量は患者の

年齢、病態、症状等により適宜増減される。

【0030】以上、対象とするウイルスがHCVの場合を例にとり具体的に説明を行ってきたが、本発明の抗ウイルス剤はIRESと呼ばれる特殊な翻訳機構領域をそのウイルス遺伝子内に有するものであれば、いずれのウイルスにおいても抗ウイルス効果を発揮することができる。具体的には、HCVの他に小児麻痺の原因となるポリオウイルス(PV)、脳心筋炎の原因となる脳心筋炎ウイルス(EMCV)、口腔(咽頭粘膜)に特有の水疱や口内疹を作る口蹄疫病ウイルス(FMDV)、鼻かぜを引き起こしたり上部気道の粘膜などに自然感染するヒトライノウイルス(HRV)等のビコルナウイルスが関与する各種の疾患に対する有効な予防、または治療薬となり得る。なおビコルナウイルス科に分類されるウイルスにおいては、IRES領域のオリゴピリミジンとして通常ポリUの存在が認められる。従ってビコルナウイルス科に属するウイルスを標的としたハイブリッド化合物を提供する場合には、該ポリUとハイブリッド形成能の高い化合物、具体的にはポリA等のアデニンリッチな配列を有するものが好適に使用される。

【0031】

【発明の効果】本発明の抗ウイルス剤は、ウイルス遺伝子の特殊な翻訳機構に着目した新規な思想に基づくものであり、HCV等のIRESを有するウイルスに起因するウイルス性疾患に対する予防または治療薬を提供するものである。IRESが関与する翻訳機構は、通常の真核細胞の翻訳系にはほとんど見られない特殊なものであることから、副作用の少ない、極めて選択性の抗ウイルス剤としての利用が期待される。

【0032】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

【0033】参考例1 mRNA T7N1-19の取得

配列表の配列番号1に示すクローンT7N1-19を、pUC19のクローニングサイトに持つpUCT711-9(欧州公開特許公報第518313号)をアルカリ法、さらにはCsClを用いた密度勾配超遠心法(モレキュラークローニング、2nd edition、1.33-1.52、1989)で該プラスミドDNAを約100μg調整した。

【0034】この高純度に精製された該プラスミド10μgを制限酵素EcoRIで完全に切断し、クローンT7N1-19の3'側の1箇所で切断された線状DNAを得た。該線状DNA1μgを40mM Tris-HCl(pH8.0)、5mMDTT、50μg/ml BSA、2mM 各NTP、40mM MgCl₂、1mM スペルミジン、RNase インヒビター、50unitおよびT7 RNAポリメラーゼ、1.42μg

からなる組成の反応溶液50μlで反応を開始した。37℃で20分後、T7 RNAポリメラーゼ 10ユニットを加え、さらに37℃で20分インキュベーションした。最後にDNase I (Stratagene社製)を10ユニット(1μl)加え、30℃で10分インキュベーションし、この反応溶液にフェノール・クロロホルム溶液(フェノール:クロロホルム=1:1)50μlを加え反応を止め、混和後、水相50μlを回収し、いわゆるエタノール沈殿を行うため、3M酢酸ナトリウム(pH5.5)を5.5μlを混和して、さらにエタノール約150μlを混和して、15000rpm 15分間遠心し、得られたRNA(転写物)を乾燥させた。

【0035】得られたRNAは、30μlのDEPC処理された滅菌水(モレキュラークローニング、2nd edition、7.26、1989)に溶解され、そのうち3μlは、波長260nmの吸光度を測定し、1OD=40μg/mlとして計算し、定量した。この定量値より、得られたRNA量は約80μgであった。また、転写物の長さを見るため、ホルムアミドを用いたアガロース電気泳動(モレキュラークローニング、2nd edition、7.43、1989)を行った。その結果、得られたRNAは、シングルバンドで、しかも長さも分子量マーカー(GIBCO BRL社製:0.24-9.5Kb RNA Ladder)と比較し妥当なものであった。また、この電気泳動後のアガロースをメンブランに転写し、いわゆるノーザンハイブリダイゼーション(モレキュラークローニング、2nd edition、7.39-7.52、1989)を行い、転写物のRNAが確かにクローンT7N1-19由来であることも確認した。この時、用いたプローブはクローンT7N1-19の3'領域のクローンN19の配列を持つDNA断片より、ラベリング法により(モレキュラークローニング、2nd edition、10.13-10.17、1989)作成した。

【0036】参考例2 HCV由来蛋白質のインビトロでの合成とその解析

参考例1で合成した転写物であるmRNA T7N1-19は、1本鎖RNAであるHCVゲノム遺伝子(欧州公開特許公報第518313号)の5'領域側、2007塩基とほぼ同じ構造を持っている。異なるのは、HCV遺伝子の5'側にT7 RNAポリメラーゼに作用するT7のプロモーター増強配列を5'末端に付加している事である。

【0037】インビトロトランスレーション反応は、ウサギ赤血球ライセート(Promega社製)11.375μl、イヌマイクロゾーマルメンブラン(Promega社製)1.17μl、アミノ酸ミックス(Promega社製)5.2μl、L-[35S]-メチオニン(Amersham社製)1.3μl(729

K B q) およびRNase インヒビター(宝酒造社製) 0. 2 μ lと混ぜ、最終量14. 37 μ lとして、該転写物 約3. 5 μ gに加えて反応を開始した。基本的には、Promega(Pro mega)社の「Translation invitro Technical Manual」のプロトコールに従って反応させた。

【0038】また、試薬のロットチェックを兼ねてRNA(転写物)のみを除いた系で反応させ、何も合成されないことを確認した。また、コントロールとして、E. coli β -lactamase mRNA(Promega社製のイヌマイクロゾーマルメンブランに添付) 0. 5 μ gを、該転写物 約3. 5 μ gの代わりに用いた。

【0039】30℃で1時間15分インキュベーション後、そのままSDS-PAGE電気泳動すると、1レンジあたりの蛋白量が多すぎて合成された蛋白質の解析が困難となることが予想されたので、免疫沈降法でHCVコア蛋白質を含むポリペプチドのみを分離させ、電気泳動させた。すなわち、翻訳反応溶液全量に対して最終濃度0. 5% SDSになるように2. 5% SDSを加えた。さらに、4倍量のRIPAバッファー1(1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0. 15M NaClおよび50 mM Tris-HCl(pH 7. 5))を加え、反応液を氷上で冷やした後、抗HCVコア抗体(ラビット血清より精製、ポリクローナル抗体、1 μ g/1 μ l) 1 μ lを加え、1時間、0℃で静置。さらにザイソルビン(ザイメント社製、10% W/V) 3. 125 μ lを加えて1時間、0℃で静置。その後、3000 rpm 3分で遠心し、RIPAバッファー2(1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0. 1% SDS, 0. 15M NaClおよび50 mM Tris-HCl(pH 7. 5)) 100 μ lを加えて洗浄し、同じ操作をRIPAバッファー3(1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0. 1% SDS, 0. 15M NaCl, 50 mM Tris-HCl(pH 7. 5)および1mg/ml BSA) 100 μ lで繰り返し、最後にもう1度RIPAバッファー2で洗浄した。得られた沈殿をSDSローディングバッファー(9. 1% Tris-HCl(pH 6. 8)、16. 1% (v/v) グリセリン、4. 2Mウレア、3. 15% SDS、12. 7% (v/v) β -メルカプトエタノールおよび0. 04% BPB) 8 μ lでサスペンションした。

【0040】次に、これらの試料を95℃、5分間煮沸した。このようにして得られた試料8 μ lを、0. 1% SDS-15. 0%ポリアクリルアミドゲル(70×85×1mm)に添加した。その際、マーカータンパク質としてAmersham社製「Rainbow [14C] methylated protein molecular

weight markers」(分子量レンジ14300から200000)を使用した。電極液としてトリス緩衝液(25 mM トリス(pH 8. 3)、192 mM グリシンおよび0. 1% SDS)を用い、30 mAの定電流で45分間泳動後、ワットマン3MMの紙の上にのせ、透明のラップフィルム(サンランラップ)を上からかぶせてゲルドライヤーでゲルを乾燥させた。乾燥されたゲルは富士写真フィルム社製イメージングプレート(TYPE BAS-III)にはさんで、指定のカセットに入れ(この操作は富士写真フィルム社製バイオイメージアナライザー BAS 2000(BIO-IMAGE ANALYZER)のプロトコールに従った)、約12時間室温放置した。イメージングプレートをバイオイメージアナライザーで解析することにより、³⁵SメチオニンにラベルされたHCV由来コア蛋白約22 KDaとその前駆体蛋白質(555アミノ酸からなるポリペプチド)約61 KDaがシャープなバンドとして検出された。

【0041】参考例3 ハイブリッド化合物の合成
アプライドバイオシステム社(Applied Biosystems社)のDNAシンセサイザー394型で、ホスホチオエート型のオリゴヌクレオチドを合成した。添付のプロトコールに従って、合成中に付加された塩基の保護基をはずして、さらにHPLCによって目的の長さのホスホチオエート型のオリゴヌクレオチドを精製した。これは、ホスホジエステル型と違い1ピクーに分離されないが、目的とするホスホチオエート型ジアステロマーは全てまとめて1ロットとした。その後、5'末端の水酸基についている保護基(ジメトキシトリル基)を常法により酢酸水溶液で脱保護し、さらにフェノール処理をした後波長260 nmでの吸光度により定量して調整して、目的のハイブリッド化合物を得た(この時、1OD=35 μ g/mlとして換算された)。

【0042】実施例1 組換えワクシニアウイルスrv5CLの作製

【1】組換えワクシニアウイルス作製用トランスファベクターの作製

特開昭63-63380号公報の実施例1に記載の方法に従い、ワクシニアウイルスWR株よりHA蛋白遺伝子を精製した。すなわち、ワクシニアウイルスWR株のウイルスを精製し、50 mM Tris-HCl(pH 7. 4) (1 mM

【0043】EDTA及び0. 5% ドデシル硫酸ナトリウム含有)中に懸濁し、プロテイナーゼKを250~1000 μ g/mlに加えて37℃にて一夜インキュベートした後、緩衝液で飽和されたフェノール:クロロホルム(1:1)で3回抽出し、そしてエタノールによりウイルスDNAを沈殿させた(エタノール沈殿とは、水相に10分の1量の3 M酢酸ナトリウムもしくは等量の

4 M酢酸アンモニウムと水相の2.5倍容のエタノールを加え混和し、半径5cm程度のロータ用いて15,000rpm, 4°Cで15分間冷却遠心を行い、その沈殿を乾燥させる処理。以下同様)。このDNAを10mM Tris-HCl (pH8.0) (1mM EDTA含有)に溶解し、HindIIIにより消化し、アガロースゲル電気泳動により約50kbのHindIIIA断片を単離した。このHindIIIA断片を、高塩濃度緩衝液 (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT (pH7.5)) 中でSalIにより消化し、HindIIIA断片の3'末端に存在する約1.8kbのHindIIIA-SalI断片を、アガロース電気泳動により単離した。このDNAをT4 DNAポリメラーゼで平滑末端とした。さらにこのDNAをライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて、マルチクローニングサイト内にあるHindIII I 及びEcoRIで消化し、さらにT4 DNAポリメラーゼで平滑末端としたpUC19クローニングベクターに組み込んだ。

【0044】また、特開昭63-63380号公報の実施例4に記載の方法に従いワクシニアウイルスWR株より7.5k蛋白質プロモーター断片を精製した。すなわち、上記のように調製したウイルスDNAを高塩濃度緩衝液中でSalIにより消化し、アガロース電気泳動により分離することにより、約0.9kbのSalI断片を得た。他方、プラスミドpUC18を高塩濃度緩衝液中でSalIにより消化し、フェノール抽出及びエタノール沈殿により分離することにより、線状プラスミドを得た。次に、前記約0.9kbのSalI断片と線状プラスミドとをライゲーション緩衝液 (6.6mM Tris-HCl, 1mM ATP, 5mM MgCl₂, 5mM DTT (pH7.6)) 中でT4DNAリガーゼにより連結し、この反応混合物を用いて大腸菌JM103株を形質転換した。形質転換クローンからのプラスミドをSalIにより消化することにより切り出した上記DNA断片をRsaI, AluI, HapI I 及びDdeIで消化してスクリーニングすることにより、プラスミドp0901を得た。このプラスミドを中塩濃度緩衝液 (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT (pH7.5)) 中でRsaI及びHincIIで消化し、アガロース電気泳動で分離することにより、0.26kbからなる平滑末端のRsaI-HincII断片を得た。かかる断片中に、7.5k蛋白質プロモーターが含まれる。このDNAをライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて、マルチクローニングサイト内にあるHincIIで消化したpUC19クローニングベクターに組み込んだ。

【0045】上記のライゲーションに用いたベクターDNAとしては、次の様に用意されたものを5ng~10

ng使用した。即ち、pUC19クローニングベクターを制限酵素HindIII及びEcoRI、またはHincII (東洋紡績社製)で切断し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿させた後、さらにアルカリリソスファターゼ(ペーリングガーマンハイム社製)で5'末端を脱リン酸化して〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿させた。

【0046】この様にして作成したDNAを用いて大腸菌JM109を形質転換させた(この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテントハイ(COMPETENT HIGH)のプロトコールに従った。このようにして得られた組換え体から常法によりミニスクリーニングを行い〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、pUCのマルチクローニングサイトにあるEcoRI側にHA蛋白遺伝子の5'側があるプラスミドを選択し、pUCHAと命名した。また、7.5kプロモーターの5'側がpUC19のマルチクローニングサイトにあるHindII I側にくるようなプラスミドを選択し、pUC7.5と命名した。

【0047】このようにして得られた形質転換体pUC HA及びpUC7.5からそれぞれプラスミドDNAを調製し、デュポン社製蛍光シーケンサーGENESIS 2000システムを用いて、配列を決定した。シーケンスプライマーとして次の2種の合成プライマー5'd(GTAAACGACGGCCAGT)3' (配列表の配列番号20)、5'd(CAGGAAACAGCTATGAC)3' (配列表の配列番号21)を用いた。

【0048】次に、pUC7.5プラスミド1μgを制限酵素SmaIで切断し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿させ、さらにアルカリリソスファターゼ(ペーリングガーマンハイム社製)で5'末端を脱リン酸化して〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、フェノール/クロロホルム処理し、エタノール沈殿させた。このようにして得たDNA 10ngに、合成リンカ-5'd (pCAGATCTGCAAGCTTG)3' (配列表の配列番号22) 5ngをライゲーションキット(宝酒造社製)を用い挿入した。この様にして作成したDNAを用いて大腸菌DH5を形質転換させた(この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテントハイ(COMPETENT HIGH)のプロトコールに従った。この様にして得た組換え体から、常法によりミニス

クリーニングを行い〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、上記の合成リンカーが7. 5 kプロモーターと順方向にBgl I I I, Hind I I Iとなるよう組み込まれたプラスミドpUC7. 5 GHを得た。

【0049】このプラスミドを用いてSaikiらの方法〔ネーチャー(Nature), 324, 126, (1986)〕に準じて、いわゆるPCR法により特異的配列を持つDNAを増幅し、7. 5 kプロモーターの改変を行った。即ち、プラスミドpUC7. 5 GH 10 ng, 10×PCR緩衝液(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1%ゼラチン) 10 μl, 1.25 mM 4 dNTP 16 μl, 合成DNAプライマー5' d(CAGGAAACAGCTATGAC) 3' (配列表の配列番号23) 及び5' d(GAATAGTTTTCAA TTTTACG) 3' (配列表の配列番号24) 各(20 μM) 5 μl、または5' d(CGTAAAAA TTGAAAAAACTATTTC) 3' (配列表の配列番号25) 及び5' d(GTAAAACGACGGCCA GT) 3' (配列表の配列番号26) 各(20 μM) 5 μl、に水を加えて合計が100 μlになるようにして、まず95°Cに5分間保温後、0°Cに急冷した。1分後、Taq DNAポリメラーゼ(7ユニット/μl, AmpliTaq™宝酒造社製) 0.5 μlを加え混和後、ミネラルオイルを重層した。このサンプルを、パーキンエルマー シータス社製のDNA Thermal Cyclerで95°C 1分、48°C 1分、72°C 1分で30回処理した。最後に72°Cで7分保温した後、この反応水溶液をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、それぞれ250 bpと110 bpの2本の増幅DNA断片を得、5%アクリルアミドゲルで精製した。次に、このようにして得たDNA断片各5 ng, 10×PCR緩衝液(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1%ゼラチン) 10 μl, 1.25 mM 4 dNTP 16 μl, 合成DNA 5' d(CAGGAAACAGCTATGA

5' d(GATCCAAAAATTGAAAAACTAGTCTAATTAT
3' (GTTTTAACCTTTGATCAGATTAAATA
TGCACCGGA) 3'
ACGTGCCTCTAG) 5'

を常法により挿入し(ライゲーションには、宝酒造社製のライゲーションキットを用い、方法は宝酒造社のライゲーションキット用のプロトコールに従った)、大腸菌DH5を形質転換しミニスクリーニングにより順方向に合成DNAが6個タンデムに挿入されたプラスミドpUC SEを得た。

【0052】このようにして得られたプラスミドpUC SEを制限酵素Pst I 及びEco RIで切断し、フェ

C) 3' (配列表の配列番号23) 及び5' d(GTA AAACGACGGCCAGT) 3' (配列表の配列番号26) 各(20 μM) 5 μl、に水を加えて合計が100 μlになるようにして、まず95°Cに5分間保温後、0°Cに急冷した。1分後、Taq DNAポリメラーゼ(7ユニット/μl, AmpliTaq™宝酒造社製) 0.5 μlを加え混和後、ミネラルオイルで重層した。このサンプルを、パーキンエルマー シータス社製のDNA Thermal Cyclerで95°C 1分、48°C 1分、72°C 1分で30回処理した。最後に72°Cで7分保温した後、この反応水溶液をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、330 bpの増幅DNA断片を得、制限酵素Eco RI 及びPst Iで消化し、5%アクリルアミドゲルで精製した。このようにして得られたDNA断片5 ngをライゲーションキット(宝酒造社製)を用いマルチクローニングサイト内にあるEco RI 及びPst Iで消化したpUC19クローニングベクターに組み込み、大腸菌DH5を形質転換させた(この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテントハイ(COMPETENT HIGH)のプロトコールに従った。この様にして得た組換え体から常法によりミニスクリーニングを行い〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、ワクシニアウイルスの強力プロモーターを持つプラスミドpUC SPを得た。該プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入されたDNA断片はデュポン社製蛍光シーケンサーGENESIS 2000システムを用いて、配列を決定した。

【0050】このようにして得られたプラスミドpUC SPのBam HI 及びBgl I I サイトに第40回日本ウイルス学会総会演説抄録4075に記載のプロモーターを両端がBam HI 及びBgl I I サイトとなるようした合成DNA(配列表の配列番号27)

【0051】

【表1】

ノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿させ、さらにT4 DNAポリメラーゼで平滑端とした後、550 bpの断片を5%アクリルアミドゲルで精製した。このようにして得られたDNA断片5 ngを制限酵素Nru Iで消化したプラスミドpUCHA10 ngとライゲーションし、大腸菌DH5を形質転換させた(この時、コンピテントセルは東洋紡績社製のものを用いた)。形質転換させる方法は、東洋紡績社製のコンピテントハイ

(COMPETENT HIGH)のプロトコールに従った。この様にして得た組換え体から、常法によりミニスクリーニングを行い〔モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 1982, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ・プレス(Cold Spring Harbor Lab. Press)〕、HA遺伝子と順方向にワクシニアウイルスプロモーターが挿入されたプラスミドpHASEを得た。該プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入されたDNA断片はデュポン社製蛍光シークエンサーGENESIS 2000システムを用いて、配列を決定した。決定されたDNA配列は該プラスミドのマルチクローニングサイトのSal IサイトからHind IIIまでを配列表の配列番号30に示す。

〔0053〕次に、HCV遺伝子の5'端からコア蛋白遺伝子までをPCR法で増幅した。即ち、欧州公開特許公報第5-18313号に記載の実施例28の〔2〕、クローンT7N119のDNA 5 ng、10×PCR緩衝液(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1%ゼラチン) 10 μl, 1.25 mM 4dNTP 16 μl、合成DNA 5' d(CGAAGCTTGCCAGC CCCCTGATGGG) 3' (配列表の配列番号28) 及び5' d(CCGGATCCCAGCTGGATGGTCAAC) 3' (配列表の配列番号29) 各(20 μM) 5 μl、に水を加えて合計が100 μlになるようにして、まず95℃に5分間保温後、0℃に急冷した。1分後、Taq DNAポリメラーゼ(7ユニット/μl, AmpliTaqTM宝酒造社製) 0.5 μlを加え混和後、ミネラルオイルを重層した。このサンプルを、バーキン エルマー シータス社製のDNA Thermal Cyclerで95℃1分、58℃1分、72℃1分で30回処理した。最後に72℃で7分保温した後、この反応水溶液をフェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、910 bpの増幅DNA断片を得、制限酵素Hind III及びBamHIで消化した後、5%アクリルアミドゲルで精製し、ルシフェラーゼアッセイ用のピッカジーンTMカセットベクター(東洋インキ製造株式会社)のHind III及びBamHIサイトに挿入した。ミニスクリーニングによりルシフェラーゼ遺伝子の上流にC型肝炎ウイルス遺伝子の5'端からコア蛋白遺伝子までが順方向に挿入されたプラスミドpCS5 CLを得た。

〔0054〕次に、プラスミドpCS5 CLを制限酵素EcoRIで部分消化後、制限酵素Hind IIIで完全消化し、2.6 kb断片をアガロースゲルより切り出し精製した。この断片をプラスミドpHASEのHind III及びEcoRIサイトに挿入し、ミニスクリーニングによりワクシニアウイルスHA蛋白遺伝子中にワクシニアウイルスプロモーター、HCV遺伝子の5'端からコア蛋白遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子の順に並

んだプラスミドpHACLを得た。

〔0055〕〔2〕組換えワクシニアウイルスrVV5 CLの作製

アフリカミドリザル腎由来細胞CV-1(理化学研究所細胞開発銀行RCB0160)を3.5 cmシャーレにセミコンフルエントに培養したものに、ワクシニアウイルスLC16m0株(臨床とウイルス, 3(3), 229-235, 1975)をMOI(multiplicity of infection) = 0.1 PFU/Cellで1時間室温で吸着させた。また、〔1〕で作製したプラスミドpHACLを、Maniatisらの方法(「モレキュラ・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、86頁~96頁(1982))に従い組換え大腸菌から回収、精製しトランスファーベクターpHACLDNAを大量に得た。このようにして得たpHACLDNA 10 μgをリポフェクチン(Lipofectin、ライフテクノロジー社製) 30 μlとOpti-MEM培地(ライフテクノロジー社製) 170 μl中で混合し、室温で10分静置しトランスフェクション液とした。

〔0056〕次にシャーレからウイルス液を除き、Opti-MEM培地で細胞を2回洗浄した後、先述のDNAを混合したトランスフェクション液にOpti-MEM 800 μlを加えたものをシャーレに入れ、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養した。4時間後培地を除き10%ウシ胎児血清を含むMEM培地をシャーレに加えた。さらに、2日間37℃、5%CO₂インキュベーターで培養した後、この感染細胞を3回凍結融解し、ウイルスを回収した。

〔0057〕このウイルス液には1 mlあたり約10⁸個のウイルスが含まれており、またそのうちの約0.1%が組換え体である。組換えウイルスを単離するためにブラーク単離法を用いた。その方法は以下の通りである。ウイルス液を10⁵倍に希釈した。予め10 cmシャーレに1枚当たり2×10⁶個のウサギ腎由来細胞RK-13(理化学研究所細胞開発銀行RCB0183)細胞をまき、培養したものを用意し、培地を完全に除いた後、10⁵倍に希釈した液を一枚のシャーレあたりそれぞれ1 mlずつ加えた。細胞の乾燥を防ぐため、シャーレを15分おきに傾けてウイルス液が全面に行き渡るようにした。このようにして室温で1時間ウイルスを吸着させた後、2%ウシ胎児血清を含むMEM培地をシャーレに加え、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養した。

〔0058〕2日後、培地を除きウイルス液を完全に吸い取り、1%ニワトリ赤血球液をシャーレ1枚あたり3 mlずつ静かに加え室温で1時間吸着させた後、完全に吸い取った。ニワトリ赤血球を吸着しないブラークをチップで吸い取り、1 ml PBS中でピペッティングして組換えウイルスを浮遊させた。これら一連の操作(感染

させてから、2日間培養し該組換えウイルスを単離する操作) をブラーク純化法と呼ぶ。該ウイルス浮遊液 2 μl をとり同様のブラーク純化法を行った。これら一連の操作を3回繰り返して野性株の混入のない HCV 由来遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子を持つ組換えウイルス r VV5C1 を得た。

【0059】 [3] 組換えワクチンアウイルス rVV5 CLによるC型肝炎ウイルス遺伝子とルシフェラーゼ遺 伝子の発現

24wellプレートに約60%コンフレントにヒト肝臓細胞由来WRL68（ヒト胎児肝細胞、ATCC CCL68）を10%ウシ胎児血清を含むT-S-2培地で培養したものに組換えワクシニアウイルスrVV5CLを2%ウシ胎児血清含むPBSに均一に混和し、MOI=4PFU/Cellで1時間室温で吸着させた。その後、Opti-MEM培地500μlで2回洗浄し、Opti-MEM培地500μlを加えて16時間、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養した。その後、培地を除き、前述のSDSローディングバッファー100μlを加えて、感染細胞を溶解後、20μlを常法に従い、煮沸し、12.5%SDS-PAGEで電気泳動した。その後、常法に従い、ニトロセルロースフィルターにウェスタンブロッティングし、欧州公開特許公報第518313号に記載の実施例と同様な方法で抗HCVコア抗体を用いて発色させた。結果を図1に示す。この結果からも分かるように、約22kDaのHCVコア蛋白がメインのバンドとして検出され、感染細胞内では、発現されたHCVコア蛋白とルシフェラーゼ蛋白の融合蛋白が細胞内シグナルペプチダーゼによりHCVコア蛋白のC末端に存在するシグナル配列を認識してプロセッシングを行ったことを示している。また、22kDaより高分子量の蛋白として検出されたバンドは、該融合蛋白遺伝子で組換わってない、ワイルドタイプのワクシニアウイルスで感染させた細胞を並べて電気泳動させ、同じ抗体で同様に発色させているにもかかわらず何も検出されないことから、プロセッシングが十分されていない該融合蛋白であろうと予想される。すなわち、ここで検出されたバンドは組換えワクシニアウイルスrVV5CL

また対照として、以下のハイブリッド化合物も調製した。

SMS 39 20 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
(配列表の配列番号 18)
SMS 41 20, , , TTTTTTTTTTTTTTTTT
(配列表の配列番号 19)

なお、上記表2および表3に示した塩基間のリン酸ジエヌチオエート結合は、すべてホスホロチオエート型で合成した。

Lが細胞内で発現させたHCVコア蛋白とルシフェラーゼ蛋白の融合蛋白由来であろうと予想できる。

【0060】また、該感染細胞内でのルシフェラーゼ蛋白の発現の検出として、東洋インキ製造株式会社より販売されているピッカジーンキット付属の細胞溶解液と基質発色液を使用した。即ち、前述のように、培養された感染細胞へ SDSローディングバッファーの代わりに該細胞溶解液を 500 μ l 入れ、室温で 30 分放置後、該基質発色液 8 μ l へ 5 μ l を混和し、10 秒後に、ペルトールドジャパン社製 MUL TI - B I O L U M A T LB 9505C で測定した。その結果、感染させてない細胞（バックグラウンド）に比して細胞溶解液 5 μ lあたり約 10⁵ 以上の酵素量は発現していることが分かった。

【0061】実施例2 ハイブリッド化合物による細胞内でのHCV遺伝子の翻訳阻害効果

[1] ハイブリッド化合物の合成と調製

前述したように、HCV遺伝子のIRES領域は5'UTR領域に存在する。そこで、配列表の配列番号1に記載の塩基番号で27番目のチミンから始まり401番目のシトシンまでの領域の中で、特にピリミジン（シトシン）リッチな領域を対象として、ハイブリッド化合物でハイブリット形成させたい領域を指定し、指定された塩基配列より決定される相補鎖の配列をハイブリッドオリゴヌクレオチドの配列とした。

【0062】ハイブリッド化合物は、前述の参考例3に記載の方法に従って合成した。該ハイブリッド化合物は、超純水（ミリポア社製のMilli-XQを使用。約18.3 MΩ・cmの水）をオートクレーブした滅菌水に溶かした。濃度は、波長260 nmでの吸光度により得られた値をnearest-neighbor法 (Methods in Enzymology, 1989, ACADEMIC PRESS, vol. 180, 304-325) で定量した。更に、ミリポア社製UFC3 OGVOSを用いて滅菌された。調製したハイブリッド化合物の配列は、以下の通りである。

[0063]

【表2】

[0064]

【表 3】

【0065】(2)ハイブリッド化合物による細胞内のHCV由来蛋白の翻訳阻害測定系 24wellプレートに約6.0%コンフルエントのヒト

肝臓細胞由来WRL68を10%ウシ胎児血清を含むT-S-2培地で培養したものに組換えワクシニアウイルスrVV5CLを2%ウシ胎児血清含むPBSに均一に混和し、MOI=0.01PFU/Cel1で1時間室温で吸着させた。その後、すぐにOpti-MEM培地500μlで2回洗浄し、ハイブリッド化合物を添加したOpti-MEM培地500μlを加えて16時間、37℃、5%CO₂インキュベーターで培養した。実施例1の〔3〕で記述したように、感染細胞は培地を除いた後、ピッカジーン細胞溶解液500μlを加え、室温で30分放置され、よく混和された後、該基質発色液80μlへ8μlを混和し、10秒後に、ベルトールドジャパン社製MULTI-BIOLUMAT LB9505Cで27℃、2.5分間、測定した。検量線を書くために、1%BSAを含むPBSで希釈されたルシフェラーゼを10⁻¹⁵、10⁻¹⁶、10⁻¹⁷、10⁻¹⁸、10⁻¹⁹mol/μlに調製しスタンダード試薬として用いた。このスタンダード試薬を上記のように該基質発色液80μlへ8μlを混和し、測定した。

【0066】スタンダード試薬のルシフェラーゼ濃度の常用対数とその測定値(蛍光の積算値)の常用対数が1次関数として直線に乗るので、これを検量線とした。感染細胞中に発現されたルシフェラーゼの量は、測定値(蛍光の積算値)に対応する蛋白量を検量線から求めた。このようにして得られたルシフェラーゼの量は、HCV由来コア蛋白とルシフェラーゼの融合蛋白遺伝子からの該融合蛋白発現量として評価した。

【0067】該遺伝子のIREの予測には、5'非翻訳領域からHCV遺伝子のエンベロープ1領域付近(配列表の配列番号1に示す塩基番号で1から1200番に相当する)のRNAの配列から2次構造を解析プログラムFOLD(UWGCG Software, Uni

v. Wisconsin)によって解析し、参考にした。

【0068】結果を図2に示す。これらのハイブリッド化合物は、感染細胞の培地に最終濃度が5μM、1μM、0.5μM、0.25μMとなるような条件で添加した。1回に全く同じ条件で細胞に感染させ、アッセイできる検体数には限りがあるので、1度に用意した24wellプレートの枚数は、操作上、実験条件がずれない程度の範囲を考慮して、最大6プレートとした。ハイブリッド化合物の濃度の種類数は、このことからも制限されたので、毎回必ずハイブリッド化合物を入れないウェル(標準は4ウェル)を作り、また効果のない対照の化合物(前記表2)も対象として必ず入れて指標とした。細胞密度やインフェクション時間、インフェクション後の培養時間の条件において若干異なったが、5μMで行った実験においては、SMS38についてのルシフェラーゼの発現量が、効果の殆どない化合物(SMS39およびSMS41)に対して約5分の1にまで減少させた。また、SMS38においては、用量依存的にルシフェラーゼの発現量を減少させることも確認された。

【0069】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2033

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

アンチセンス: No

トポロジー: 直鎖状

起源: Hepatitis C virus

直接の起源

クローン名: T7N1-19

配列

ACTACTTAAT	ACGACTCACT	ATAGGCTGCC	ACCCCCCTGA	TGGGGCCGAC	ACTCCACCAT	60
AGATCACTCC	CCTCTGAGGA	ACTACTGTCT	TCACCCAGAA	ACCCGCTAGC	CATGGCGTTA	120
CTATGACTGT	CGTGCAGCCT	CCAGGACCCC	CCCTCCCCCG	AGAGCCATAG	TGGTCTGCCG	180
AACCGCTCAG	TACACCGGAA	TTGCCACCGAC	GACCCCGTCC	TTTCTTGGAT	CAACCCGCTC	240
AATGCCCTGGA	GATTTGGGCC	TGCCCCCCCG	AGACTGCTAG	CCGACTACTG	TTGGGTGCCG	300
AAAGGCCTTC	TGCTACTGCC	TCATAGGGTC	CTTGGCACTG	CCCCGGGAGG	TCTCGTAGAC	360
CGTGCATC	ATG ACC ACA	AAT CCA AAA	CCC CAA AGA AAA	ATC AAA CCT AAC	410	
	Met Ser Thr Asn	Pro Lys Pro	Gln Arg Lys	Ile Lys Arg	Asn	
1	5	10	15	20	25	30
ACC AAC CGC CGC	CCA CAG GAC	GTT AAG TTC CCG	GGC GGT GCT CAG	ATC	458	
Thr Asn Arg Arg	Pro Gln Asp	Val Lys Phe	Pro Gly Gly	Gln Ile		
15	20	25	30			
GTT CGT GGA CTT	TAC CTG TTG	CCG CCC AGG	GCC CCC AGG	TTG GGT CTG	506	
Val Gly Val	Tyr Leu Leu	Pro Arg Arg	Gly Pro Arg	Leu Gly Val		
35	40	45				
CCC CGC ACT AGG	AAG ACT TCC	GAG CGG CAA CCT	CGT GGA AGG CCA	554		
Arg Ala Thr Arg	Lys Thr Ser	Glu Arg Pro	Gln Pro Arg	Gly Arg Arg		

50	55	60	
CAA CCT ATC CCC AAG CCT CGC CAA CCC GAG CCT AGG CCC TGG GCT CAG			602
Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly Arg Ala Trp Ala Gln			
65	70	75	
CCC CGG TAC CCT TGG CCC CTC TAT CGC AAT GAG CCC TTC GGG TGG GCA			650
Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala			
80	85	90	
GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGG CCC TCC CGG CCT ACT TGG CCC CCC ACG			698
Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr			
95	100	105	110
GAC CCC CGG CCT AGG TCG CCT AAT TTG GCT AAC GTC ATC GAT ACC CTC			746
Asp Pro Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu			
115	120	125	
ACA TGC CGC TTC CCC GAC CTC ATG CGG TAC ATT CCG CTC GTC CGC CCC			794
Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala			
130	135	140	
CCC CTA CGG CGC CCT GCC AGG GCT CTA CGG CAT CGC GTC CGG GTT CTC			842
Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu			
145	150	155	
GAG GAC CGC GTG AAC TAT GCA ACA CGG AAT CTG CCT CGT TGC TCC TTT			890
Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe			
160	165	170	
TCT ATC TTC CTT TTG GCT TTG CTG TCC TGT TTG ACC ATC CCA GCT TCC			938
Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Ile Pro Ala Ser			
175	180	185	190
GCC TAC CAA GTG CGC AAC CGG TCC CGG GTG TAC CAT GTC ACC AAC GAC			986
Ala Tyr Gln Val Arg Asn Ala Ser Gly Val Tyr His Val Thr Asn Asp			
195	200	205	
TCC TCC AAC TCA ACT ATT GTC TAT GAG CCC CGG GAC GTG ATT ATG CAC			1034
Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Val Ile Met His			
210	215	220	
ACC CCC CGG TCC GTG CCC TGC GTC CGG GAG AAC AAT TCC TCC CGC TCC			1082
Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Asn Asn Ser Ser Arg Cys			
225	230	235	
TGG GTC CGG CTC ACT CCC ACG CTT CGG CCC AGG AAC ACC ACC ATC CCC			1130
Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Leu Ala Ala Arg Asn Ser Ser Ile Pro			
240	245	250	
ACT ACG ACA ATA CGG CGT CAT GTC GAC TTG CTC GTT CGG GCA GCT GCT			1178
Thr Thr Thr Ile Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ala Ala Ala			
255	260	265	270
CTC TGT TCC GCT ATG TAT GTC CGG CAT TTT TGC GCA TCT GTT TTC CTC			1226
Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Phe Cys Gly Ser Val Phe Leu			
275	280	285	
GTC TCC CAG CTG TTC ACT TTC TCA CCT CGC CGG TAT GAG ACC GTC CAA			1274
Val Ser Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg Tyr Glu Thr Val Gln			
290	295	300	
GAC TCC AAT TGC TCA ATC TAT CCC CGC CAT GTC TCA CGC CAT CGC ATC			1322
Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Val Ser Gly His Arg Met			
305	310	315	
GCT TCG GAT ATC ATA ATC AAT-TGG TCA CCT ACA ACA CGC CTA GTC GTC			1370

Ala Trp Asp Met Ile Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val Val
 320 325 330
 TCG CAG CTA CTC CGG ATC CCA CAA CCC CTG GTG GAT ATC GTG CCA CGG 1418
 Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Val Val Asp Met Val Ala Gly
 335 340 345 350
 GCC CAC TCG CGA GTC CTG CGC CGC CTT CCC TAC TAT TCC ATC GTG CGG 1466
 Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Leu Ala Tyr Tyr Ser Met Val Gly
 355 360 365
 AAC TCG GCT AAC GTC TTG GTT CTG ATG CTG CTC TTC CCC GCT CTT GAC 1514
 Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Met Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp
 370 375 380
 CGG CGG ACC CAC GTG ACA CGG CGG AAC GCA GCC TAC ACC ACC CAG CGC 1562
 Gly Gly Thr His Val Thr Gly Gly Lys Val Ala Tyr Thr Thr Gln Gly
 385 390 395
 TTT ACA TCC TTC TTT TCA CGA CGG CGG TCT CAG AAA ATC CAA CTT GTC 1610
 Phe Thr Ser Phe Phe Ser Arg Gly Pro Ser Gln Lys Ile Gln Leu Val
 400 405 410
 AAC ACT AAC CGC ACC TGG CAC ATC AAT AGC ACT GCC CTC AAT TCC AAT 1658
 Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn
 415 420 425 430
 GAC TCC CTT AAC ACC CGG TTC CTT GCC CGG CTG TTC TAC ACC CAC AGC 1706
 Asp Ser Leu Asn Thr Gly Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Thr His Ser
 435 440 445
 TTC AAC CGG TCC CGA TGT CGG GAG CCT ATG GCC GGT TGC CGC CCC ATT 1754
 Phe Asn Ala Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Gly Cys Arg Pro Ile
 450 455 460
 GAC GAG TTC GCT CAC CGG TGG GGT CCC ATC ACT CAT GTT GTG CCT AAC 1802
 Asp Glu Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr His Val Val Pro Asn
 465 470 475
 ATC TCG GAC CAG AGG CCC TAT TGC TGG CAC TAC CGG CCT CGA CGG TCT 1850
 Ile Ser Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys
 480 485 490
 GGT ATC GTC CCC CGG TCG CAC GTG TGT GGT CGG GTG TAT TGC TTC ACC 1898
 Gly Ile Val Pro Ala Ser Gln Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr
 495 500 505 510
 CCA AGC CCT GTT GTG CGG ACC ACC GAT CCT TTC CGC CCC CCC ACG 1946
 Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe Gly Ala Pro Thr
 515 520 525
 TAC AAC TCG CGA AAC AAT GAC ACC GAT GTG CTA CTC CTC AAC AAC ACA 1994
 Tyr Asn Trp Gly Asn Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu Leu Asn Asn Thr
 530 535 540
 CGG CGG CGG CAG CGC AAC TCG TTC GGT TCT ACC TCC ATG 2033
 Arg Pro Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
 545 550 555

【0070】配列番号：2

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

配列

GGGGGGGGGG CGGGGG

【0071】配列番号：3

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GGGGGGGGGGGG GGGGGGG

【0072】配列番号：4

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GGGGGGGGGGGG GGGGGGG

【0073】配列番号：5

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GGGGGGGGGGGG GGGGGGGGG

【0074】配列番号：6

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GGGGGGGGGGGG GGGGGGGGG

【0075】配列番号：7

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGG

【0076】配列番号：8

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGG G

【0077】配列番号：9

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGG GG

【0078】配列番号：10

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

GGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGG GGG

【0079】配列番号：11

配列の長さ：24

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

16

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

17

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

18

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

19

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

20

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

21

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

22

アンチセンス：Yes

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸

23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列

CCCCGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGG

【0080】配列番号: 12

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列の種類: 他の核酸

24

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CCCCGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGG

【0081】配列番号: 13

配列の長さ: 26

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

25

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CCCCGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGG

26

【0082】配列番号: 14

配列の長さ: 27

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CCCCGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGG

27

【0083】配列番号: 15

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CCCCGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGG

28

【0084】配列番号: 16

配列の長さ: 29

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CCCCGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGG

29

【0085】配列番号: 17

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

CCCCGGGGGGG GGGGGGGGGG GGGG

30

【0086】配列番号: 18

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

AAAAA AAAAAA

20

【0087】配列番号: 19

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

アンチセンス: Yes

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸

配列

TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

20

【0088】配列番号：20

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTAAAACGAC GGGCACT

17

【0089】配列番号：21

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAGCAAACAG CTATGAC

17

【0090】配列番号：22

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAGATCTCCA AGCTTG

16

【0091】配列番号：23

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CACCAAACAC CTATGAC

17

【0092】配列番号：24

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAATACTTTT TCAATTTTTA CC

22

【0093】配列番号：25

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTAAAAATT GAAAAACTAT TC

22

【0094】配列番号：26

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTAAAACGAC GGGCACT

17

【0095】配列番号：27

配列の長さ：40

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCCAAAAA TTGAAAAACT AGTCTAATT ATTGCACCGA

40

GTTTTT AACTTTTGA TCAGATTAAA TAACGTGCCCT CTAG

【0096】配列番号：28

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGAACGTTCC CAGCCCCCTG ATGGC

25

【0097】配列番号：29

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGGATCCCC GAAGCTGGCA TCCTCAAC

28

【0098】配列番号：30

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：2360

起源：Vaccinia virus

配列の型：核酸

直接の起源：pHASE

鎖の数：二本鎖

配列

TCGACCATTC TTCATGATGG CAACATTTAT ATATCTGGAC GTTACAACAA TACTACTGTA 60
 GTTAATGTAAT TATCGAATCT ACTCCTTAGC TATAATCCGA TATATGATGA ATGGACCAAA 120
 TTATCATCAT TAAACATTCC TAGAATTAAT CCCGCTCTAT GCTCAGCCCA TAATAAATTAA 180
 TATCTAGGAG GAGGAATATC TGATGATGTT CGAACTAATA CATCTGAAAC ATACGATAAA 240
 GAAAAAGATT GTTGGACATT GGATAATGGT CACGTGTTAC CACCCAATTAA TATAATGTTAT 300
 AAATGCCAAC CGATTAACAA TAAATATCCA TTGAAAAAA CACACTACAC GAATGATTAA 360
 CTAAAGTATT TCGAAAGTTT TATAGCTAGT TGATAGAACAA AAATACATAA TTTTGTAAAA 420
 ATAAATCACT TTTTATACTA ATATGACACG ATTACCAATA CTTTTGTTAC TAATATCATT 480
 ACTATACGCT ACACCTTTTC CTCACACATC TAAAAAAATA GGTGATGATG CAACTCTATC 540
 ATGTAATCCA AATAATACAA ATGACTACGT TCTTATGACT CCTTGGTATA AGGAGCCCAA 600
 TTCCATTATT CTTTTAGCTG CTAAAAGCGA CCTCTTGTAT TTTGATAATT ATACCAAGCA 660
 TAAATATCT TACGACTCTC CATAAGATGA TCTACTTACA ACTATCACAA TTAAATCATT 720
 GACTGCTAGA GATGCCCGTA CTTATGTTAG TGCAATTCTTT ATGACATCAA CTACAAATGA 780
 CACTGATAAA CTAGATTATG AAGAATACTC CACAGACTTG ATTGAAATAA CAGATACTCA 840
 ATCGACTATA GACATAATAC TATCTGGATC TACACATTCA CCAGAAACTA CCTAGTTCTG 900
 AGAAACACAGA GGATATAACAT AATTGAAATT CCTCTCGGT ATTGAAATC GGTCGACAT 960
 CTATATACTA TATACTAATA CCAACTCTCA AGACTACGAA ACTGATACAA TCTCTTATCA 1020
 TCTGGTAAT CTTCTCGATG TCGATAGCCA TATGCCCGGT AGTTGGATA TACATAAACT 1080
 GATCACTAAT TCCAAACCCA CCCACTTTT ATACTAACTT TTTCAACCAT AAATAATAAA 1140
 TACAATAATT AATTGAACTG AAAAATTCAA AAACATTCTC AATTGAAATTCC AGCGTAAGCA 1200
 ACTAGAAATCA TAAAGAACAG TGACTCTAGA GGATCCAAA ATTGAAAAC TACTCTAATT 1260
 TATTGACCG AGATCCAAA ATTGAAAAC TACTCTAATT TATTGACCG AGATCCAAA 1320
 ATTGAAAAC TACTCTAATT TATTGACCG AGATCCAAA ATTGAAAAC TACTCTAATT 1380
 TATTGACCG AGATCCAAA ATTGAAAAC TACTCTAATT TATTGACCG AGATCCAAA 1440
 ATTGAAAAC TACTCTAATT TATTGACCG AGATCTGCA CCTTGGGTA CCGAGCTCCA 1500
 ATTGACACTCC GCAACCAATT ACTGATAATG TAGAAGATCA TACACACACC GTCACATACA 1560
 CTAGCTAGTC ATAGCATTAA TACAGTAAGT GCATCATCTG GAGAATCCAC AACAGACGAG 1620
 ACTCCGAAC CAATTACTGA TAAAGAACAA GATCATAACAG TCACACACAC TGTCTCATA 1680
 ACTACAGTAA GTACATCATC TCGAATTGTC ACTACTAAAT CAACCCCGA TGATCCGGAT 1740
 CTTTATGATA CCTACAATGA TAATGATACA CTACCCACCA CTACTGTAGG CGCTAGTACA 1800
 ACCTCTATTA GCAATTATAA AACCAAGCAC TTTGTAGAAA TATTGCTAT TACCCATTAA 1860
 ATTATATTGT CGGCCGTGCC AATATTCTGT ATTACATATT ATATATATAA TAAACCTTCA 1920
 CCTAAATACA AAACACACAA CAAACTCTAG ATTTTGACT TACATAATG TCTGGATAG 1980
 TAAATCTAT CATATTGAGC CGACCATCTG GTTCAGGAAA GACACCCATA CCCAAACAC 2040
 TATGGAAATA TATTGCGATT TCTGCTGTCC CATACCACTA GATTTCTCG TCTTATGAA 2100
 CGACAAGGTG TCGATTACCA TTACCTAAC AGAGAGGCCA TCTGGAAGGG AATAGCCGCC 2160
 CGAAACTTTC TAGAACATAC TGACTTTTA CGAAATATTTC ACGGAACTTC TAAACTGCT 2220
 GTGAATACAG CGGCTATTAA TAATCGTATT TGTGATGG ATCTAAACAT CGATGGCGTT 2280
 ACAACTCTTA AAAATACGTA CCTAATGCCCT TACTCGGTGT ATATAAGACC TACCTCTCTT 2340
 AAAATGTTG ACACCAAGCT 2360

【0099】配列番号：31

配列の型：核酸

配列の長さ：4987

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源：Vaccinia virus, Hepatitis C virus, Firefly

luciferase gene

直接の起源：pHA5CL

配列

TCGACGATTG	TTCATGATGG	CAAGATTTAT	ATATCTGGAG	CTTACAACAA	TACTACTGTA	60
CTTAATCTAA	TATCCAATCT	ACTCCTTACCA	TATAATCCGA	TATATGATCA	ATGGACCAAA	120
TTATCATCAT	AAACATTCC	TAGAATTAAT	CCCCCTCTAT	GGTCAGCCCA	TAATAAATTAA	180
TATGTAGGAC	GACCAATATC	TCATGATCTT	CGAACTAATA	CATCTGAAAC	ATACGATAAA	240
AAAAAACATT	GTGGACATT	GGATAATCGT	CACCTGTTAC	CACCCATTAA	TATAATGTAT	300
AAATGCCAAC	CGATTAAACA	AAATATCCA	TTGAAAAAAA	CACAGTACAC	GAATCATT	360
CTAAACTATT	TCCAAACTTT	TATAGCTACT	TCATAGAACAA	AAATACATAA	TTTTCTAAAA	420
ATAAAATCACT	TTTTTACTA	ATATGACACC	ATTACCAATA	CTTTGTTAC	TAATATCATT	480
AGTATACGCT	ACACCTTTTC	CTCAGACATC	AAAAAAAATA	GGTGATGATC	CAACTCTATC	540
ATCTAATCGA	AATAATACAA	ATGACTACCT	TGTTATGAGT	GCTTGGTATA	AGGAGCCAA	600
TTCCATTATT	CTTTTACCTG	CTAAAACCGA	CCTCTTGTAT	TTTGATAATT	ATACCAAGGA	660
TAAAATATCT	TACCACTCTC	CATACGATCA	TCTACTTACA	ACTATCACAA	TTAAATCATT	720
GACTGCTAGA	GATGCCCGTA	CTTATGATG	TGCATTCTTT	ATGACATCAA	CTACAAATGA	780
CACTGATAAA	GTACATTATG	AAGAATACTC	CACAGACTTG	ATTGTAATA	CAGATACTGA	840
ATCGACTATA	GACATAATAC	TATCTGGATC	TACACATTCA	CCAGAAACTA	GCTACTTCTC	900
AGAAACCAGA	GGATATAGAT	AATTAAATT	GCTCCTCGGT	ATTGAAATC	GGGTCGACAT	960
CTATATACTA	TATACTAATA	CCAATACTCA	AGACTACGAA	ACTGATACAA	TCTCTTATCA	1020
TGTGGCTAAT	GTTCCTCGATG	TCGATACCCA	TATCCCCGGT	AGTTGGATA	TACATAAACT	1080
GATCACTAAT	TCCAAACCCA	CCCACCTTTT	ATACTAAGTT	TTTCACCCAT	AAATAATAAA	1140
TACAATAATT	AATTCTCGT	AAAAATTCAA	AAACTATTCT	AATTATTCC	ACGGTAAGGA	1200
ACTAGAATCA	AAAGAACAC	TGACTCTAGA	CGATCCAAA	ATTGAAAAC	TAGTCTAATT	1260
TATTGCCACGG	AGATCCAAA	ATTGAAAAC	TAGTCTAATT	TATTGCCACGG	AGATCCAAA	1320
ATTGAAAAC	TAGTCTAATT	TATTGCCACGG	AGATCCAAA	ATTGAAAAC	TAGTCTAATT	1380
TATTGCCACGG	AGATCCAAA	ATTGAAAAC	TAGTCTAATT	TATTGCCACGG	AGATCCAAA	1440
ATTGAAAAC	TAGTCTAATT	TATTGCCACGG	AGATCTGAA	GCTTGGCCAGC	CCCCCTGATGC	1500
CGGGCACACT	CCACCATAGA	TCACTCCCCT	GTGAGGAACT	ACTGTCCTCA	CCGCACAAAGC	1560
GTCTAGCCAT	GGCGTTAGTA	TGACTGTCCTG	GCAGCCTCCA	GGACCCCCCCC	TCCCCGGAGA	1620
GCCATAGTGG	TCTGGGAAC	CCGTGACTAC	ACCGGAATTG	CCAGGACGAC	CGGGTCCTTT	1680
CTTGGATCAA	CCCCCTCAAT	CCCTGGACAT	TTGGGCTGCG	CCCCGGAGA	CTGCTAGCCC	1740
ACTACTGTTG	GGTGGCGAAA	GGCCTTGTGG	TACTGCTGA	TACGGTGCTT	CCGACTGCCC	1800
CGGGAGGCTCT	CCTACACCGT	CCATC	ATG ACC ACA AAT CCA AAA CCC CAA AGA			1852

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg

1 5

AAA ATC AAA CGT AAC ACC AAC CGC CGC CCA CAG GAC	GTT AAG TTC CCG		1900
Lys Ile Lys Arg Asn Thr Asn Arg Arg Pro Gln Asp	Val Lys Phe Pro		
10 15 20 25			
GGC GGT CGT CAG ATC GTT GGT GGA CTT TAC CTG TTG	CCG CCC AGG GCG		1948
Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu	Pro Arg Arg Gly		
30 35 40			
CCC AGC TTC GGT CTC CCC CGG ACT AGC AAG ACT TCC	GAC CGG CCC CAA		1996
Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser	Glu Arg Pro Gln		
45 50 55			
CCT CGT CGA AGG CGA CAA CCT ATC CCC AAG CCT CCC	CAA CCC GAG GGT		2044
Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro Ile Pro Lys Ala Arg	Gln Pro Glu Gly		
60 65 70			
AGG CCC TCG CCT CAG CCC CGG TAC CCT TGG CCC CTC	TAT GGC AAT GAC		2092
Arg Ala Trp Ala Gln Pro Gly Tyr Pro Trp Pro Leu	Tyr Glu Asn Glu		

75	80	85	
GGC TTG GGG TCG CCA CGA TCG CTC CTC TCA CCC CGC CCC TCC CGC CCT			2140
Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro			
90	95	100	105
ACT TCG CCC CCC ACG GAC CCC CGG CGT AGC TCG CGT AAT TTC CGT AAC			2188
Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys			
110	115	120	
CTC ATC GAT ACC CTC ACA TCC CGC TTC CCC GAC CTC ATC GGG TAC ATT			2236
Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile			
125	130	135	
CCG CTC GTC GGC CCC CCC CTA CGG CGC CCT GCC AGG CCT CTA CGG CAT			2284
Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His			
140	145	150	
GGC CTC CGG CTT CTC GAC GAC CCC CGC CTG AAC TAT GCA ACA CGG AAT CTC			2332
Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu			
155	160	165	
CCT CGT TGC TCC TTT TCT ATC TTC CTT TTC CCT TTG CTG TCC TGT TTG			2380
Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu			
170	175	180	185
ACC ATC CCA CCT TCC CGG ATC CAA ATG GAA GAC GCC AAA AAC ATA AAC			2428
Thr Ile Pro Ala Ser Gly Ile Gln Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys			
190	195	200	
AAA CGC CCG CGC CCA TTC TAT CCT CTA GAG GAT GGA ACC GCT GCA GAG			2476
Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu			
205	210	215	
CAA CTC CAT AAC GCT ATG AAC ACA TAC CCC CTG CTT CCT GGA ACA ATT			2524
Gln Leu His Ala Met Lys Arg Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile			
220	225	230	
GCT TTT ACA GAT CCA CAT ATC GAG AAC ATC ACC TAC GCG GAA TAC			2572
Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr			
235	240	245	
TTC CAA ATG TCC GTT CGG TTG GCA GAA GCT ATG AAA CCA TAT CGG CTG			2620
Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu			
250	255	260	265
AAT ACA AAT CAC ACA ATC GTC CTA TGC AGT GAA AAC TCT CTT CAA TTC			2668
Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe			
270	275	280	
TTT ATG CCC GTG TTG GGC CGG TTA TTT ATC GGA CTT CCA CTT CGG CCC			2716
Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro			
285	290	295	
GGC AAC GAC ATT TAT AAT GAA CCT GAA TTG CTC AAC AGT ATG AAC ATT			2764
Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg Glu Leu Leu Asn Ser Met Asn Ile			
300	305	310	
TCG CAG CCT ACC GTC GTG TTT GTT TCC AAA AAG CGG TTG CAA AAA ATT			2812
Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile			
315	320	325	
TTC AAC GTC CAA AAA AAA TTA CCA ATA ATC CAG AAA ATT ATT ATC ATC			2860
Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met			
330	335	340	345
CAT TCT AAA ACC GAT TAC CAG TCA TTT CAG TCG ATG TAC ACG TTC GTC			2908

Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Cln Gly Phe Cln Ser Met Tyr Thr Phe Val
 350 355 360
 ACA TCT CAT CTA CCT CCC GGT TTT AAT CAA TAC GAT TTT GTC CCA GAG 2956
 Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu
 365 370 375
 TCC TTT GAT CGT GAC AAA ACA ATT GCA CTG ATA ATG AAT TCC TCT GGA 3004
 Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly
 380 385 390
 TCT ACT GGG TTA CCT AAG GGT GTG GCC CTT CCG CAT AGA ACT GCC TGC 3052
 Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys
 395 400 405
 GTC AGA TTC TCG CAT GCC AGA GAT CCT ATT TTT GGC AAT CAA ATC ATT 3100
 Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Phe Gly Asn Cln Ile Ile
 410 415 420 425
 Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val Val
 Pro Phe His His Gly Phe Gly
 430 435 440
 ATG TTT ACT ACA CTC GGA TAT TTG ATA TCT GCA TTT CCA CTC GTC TTA 3196
 Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu
 445 450 455
 ATG TAT AGA TTT GAA GAA GAG CTC TTT TTA CCA TCC CTT CAG GAT TAC 3244
 Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu Phe Leu Arg Ser Leu Cln Asp Tyr
 460 465 470
 AAA ATT CAA ACT GCG TTG CTA GTA CCA ACC CTA TTT TCA TTC TTC GCC 3292
 Lys Ile Cln Ser Ala Leu Leu Val Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala
 475 480 485
 AAA ACC ACT CTG ATT GAC AAA TAC GAT TTA TCT AAT TTA CAC GAA ATT 3340
 Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile
 490 495 500 505
 GCT TCT CGG CCC CCA CCT CTT TCG AAA GAA GTC CGG GAA CGG CTT CCA 3388
 Ala Ser Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala
 510 515 520
 AAA CGC TTC CAT CTT CCA CGG ATA CCA CAA CGA TAT CGG CTC ACT GAG 3436
 Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile Arg Cln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu
 525 530 535
 ACT ACA TCA GCT ATT CTG ATT ACA CCC GAC GGG GAT GAT AAA CCG CGC 3484
 Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly
 540 545 550
 CGC GTC CGT AAA GTT CTT CCA TTT TTT GAA CGG AAG CTT CTG GAT CTG 3532
 Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu
 555 560 565
 CAT ACC CGG AAA ACC CTG CGC GTT AAT CAG AGA CGC GAA TTA TGT GTC 3580
 Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val Asn Cln Arg Gly Glu Leu Cys Val
 570 575 580 585
 AGA CGA CCT ATG ATT ATG TCC CGT TAT GTC AAC AAT CCG GAA CGC ACC 3628
 Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr
 590 595 600
 AAC CCC TTG ATT CAC AAC CAT GGA TCG CTA CAT TCT GGA GAC ATA GCT 3676
 Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala
 605 610 615

TAC TCG CAC GAA GAC GAA CAC TTC TTC ATA GTT GAC CTC TTG AAG TCT	3724
Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe Phe Ile Val Asp Leu Leu Lys Ser	
620 625 630	
TTA ATT AAA TAC AAA CGA TAT CAG GTG GCC CCC CCT GAA TTG GAA TCG	3772
Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Cln Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser	
635 640 645	
ATA TTG TTA CAA CAC CCC AAC ATC TTC CAC CGG CGC GTG GCA GGT CTT	3820
Ile Leu Leu Cln His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu	
650 655 660 665	
CCC GAC GAT GAC CCC GGT GAA CTT CCC GCC CCT TTG CTT TTG GAG	3868
Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu	
670 675 680	
CAC CGA AAG ACC ATG ACC GAA AAA GAG ATC GTG CAT TAC GTG CCC ACT	3916
His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser	
685 690 695	
CAA GTA ACA ACC CGC AAA AAC TTG CCC GGA GGA CTT GTG TTT GTG GAC	3964
Cln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp	
700 705 710	
CAA GTA CGG AAA CGT CTT ACC CGA AAA CTC GAC CCA AGA AAA ATC AGA	4012
Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg	
715 720 725	
GAG ATC CTC ATA AAG GCC AAG GGC GGA AAC TCC AAA TTG TAA AAT	4060
Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ser Lys Leu Stop	
730 735 740	
CTAACTGTAT TCAGCCATGA CGAAATTCTT AGCTATTCTA ATCCCTCCAG GCCTCCGAGGT	4120
CGACCAATTG CCACTCCCCA ACCAATTACT GATAATCTAG AAGATCATAAC AGACACCGCTC	4180
ACATACACTA CCTACTGATA CCATTAAATAC ACTAACTCCA TCATCTGGAG AATCCACAAAC	4240
AGACCAGACT CGGGAACCAA TTACTCTAA ACAAGAACAT CATACTGCA CACACACTGT	4300
CTCATACACT ACAGTAAGTA CATCATCTGG AATTGTCACT ACTAAATCAA CCACCGATGA	4360
TCCGGATCTT TATGATACGT ACAATGATAA TGATACAGTA CCACCAACTA CTGTAGGGCC	4420
TACTACACC TCTATTAGCA ATTATAAAC CAAGGACTTT CTAGAAATAT TTGCTATTAC	4480
CCCATTAATT ATATTGTCGG CCCTGCCAAT ATTCTGTATT ACATATTATA TATATAATAA	4540
ACCTTCACGT AAATACAAAA CAGAGAACAA ACTCTAGATT TTGACTTAC ATAAATGCTC	4600
GGCATACTAA AATCTATCAT ATTGAGCCGA CCATCTGGTT CAGCAAAGAC ACCCATACCC	4660
AAAAGACTAT CGGAATATAT TTGGATTTCT GTCTCTCCAT ACCACTAGAT TTGCTCGTCC	4720
TATGGAACCA CAAGCTGTCG ATTACCATTA CGTTAACAGA GAGGCCATCT CGAACCGAAT	4780
AGCCCCCGGA AACTTTCTAG AACATACTGA CTTTTAGGA ATATTTTACG GAACTTCTAA	4840
AACTGCTGTC AATACACCGG CTATTAATAA TCGTATTTCT GTGATGGATC TAAACATCCA	4900
TGGCGTTAGA AGTCTTAAAA ATACCTACCT AATGCCCTAC TCGGTGTATA TAACACCTAC	4960
CTCTCTTAAA ATGGTTGAGA CCAACCT	4987

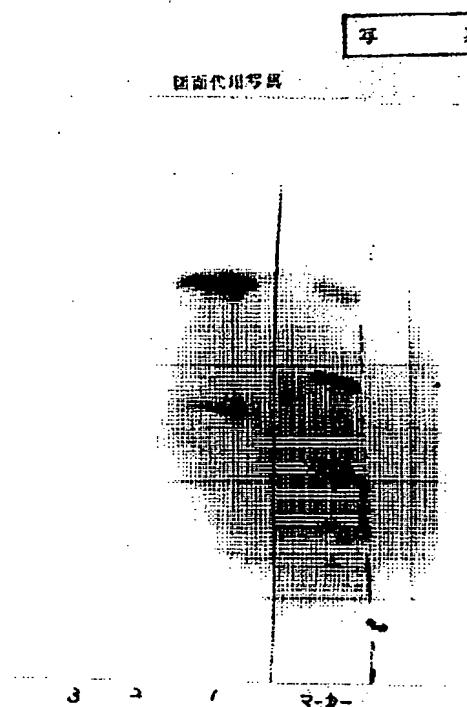
【図面の簡単な説明】

【図1】組換えワクシニアウイルスにより発現されたHCVコア蛋白をウエスタンブロッティングにて検出した結果を表す電気泳動パターンの図面である。図中、レン1は組換えワクシニアウイルスrVV5CLを、レン2および3はワイルドタイプのワクシニアウイルスの結果をそれぞれ表す。

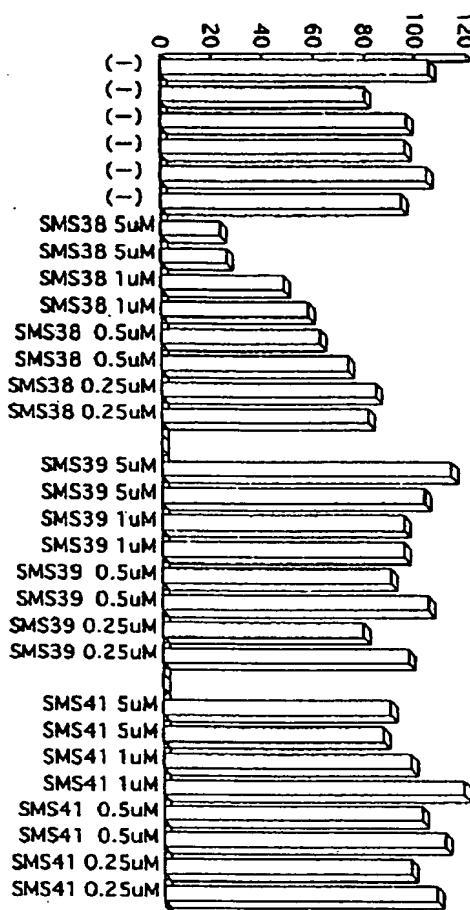
【図2】組換えワクシニアウイルスrVV5CLをWR

L68株に感染させた後に本発明の抗ウイルス剤を0.25、0.5、1、5μMとなるように添加したときの、発現されたルシフェラーゼの酵素量を測定して表した図面である。図中、(−)とは抗ウイルス剤無添加の場合の結果を表し、縦軸は(−)のルシフェラーゼ酵素量($\times 10^{-20}$ mol 1/8μM)の平均値を100としたときの相対値を表す。

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成6年6月3日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】組換えワクシニアウイルスにより発現されたHCVコア蛋白をウエスタンブロッティングにて検出した結果を電気泳動パターンで表した図面に代わる写真である。図中、レーン1は組換えワクシニアウイルスrVV5CLを、レーン2および3はワイルドタイプのワクシニアウイルスの結果をそれぞれ表す。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

// C 07 H 21/04

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

Z